

02 04263  
①

# Brevet d'invention

Certificat d'utilité

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 AVR. 2009

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réserve INPI

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>69 INPI LYON</b> LIEU <b>0304263</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>- 7 AVR. 2003</b> DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> BIOMERIEUX Département de la Propriété Industrielle Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif) INHIBEST</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date
		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date
		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		bioMérieux	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		16 73 62 03 99	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	69 280 MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.53.28 N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		catherine.duret@eu.biomerieux.com	
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

**BR2**

7 AVRIL 2009  
REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON  
LIEU 0304263  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE</b> (y a lieu)		
Nom		DENJEAN
Prénom		Frédérique
Cabinet ou Société		bioMérieux
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG 10870
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme
	Code postal et ville	16 09 12 18 10 MARCY L'ETOILE
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.75.70
N° de télécopie (facultatif)		04.78.87.21.16
Adresse électronique (facultatif)		frédérique.denjean@eu.biomerieux.com
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="text"/>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», Indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Frédérique DENJEAN Ingénieur Brevets		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> M. QUEZ

## DESCRIPTION

Le domaine de l'invention est celui de l'analyse microbiologique par voie biochimique, et en particulier de la détection et de l'identification de microorganismes, tels que  
5 notamment de bactéries ou de levures par ensemencement de milieux réactionnels.

Dans le cadre de l'invention, on s'intéresse plus particulièrement à la détection /  
identification de microorganismes, tels que notamment des bactéries ou des levures,  
pathogènes ou indicateurs de qualité, que ce soit dans le milieu médical ou le milieu  
10 industriel.

Il existe actuellement de très nombreux milieux permettant la détection de ces  
microorganismes. Cette détection peut être basée notamment sur l'utilisation de substrats  
particuliers, spécifiques d'une enzyme du microorganisme que l'on souhaite détecter.  
D'une manière générale, les substrats synthétiques d'enzymes sont constitués d'une  
15 première partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler, et d'une seconde partie  
faisant office de marqueur, généralement chromogène ou fluorescent. Ainsi dans le cas  
des bactéries, par le choix des substrats, selon qu'il y a réaction ou non, il est possible de  
caractériser la nature d'un microorganisme.

Ainsi, dans le cas de bactéries, les souches d'*Escherichia coli* sont souvent mises en  
20 évidence par la révélation d'une activité enzymatique du type osidase telle que l'activité  
 $\beta$ -glucuronidase ou  $\beta$ -galactosidase. De la même façon, le genre *Listeria* est détecté par  
la mise en évidence d'une activité  $\beta$ -glucosidase.

Une activité aminopeptidase peut également être utilisée pour révéler un groupe, un  
genre ou une espèce de bactéries. Ainsi, l'activité alanine-aminopeptidase, par exemple,  
25 permet de différencier les bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif.

Enfin, on peut citer également la détection d'une activité estérase pour notamment la  
mise en évidence du genre *Salmonella*. En effet, le genre *Salmonella* possède des  
estérases non spécifiques capables d'hydrolyser des substrats synthétiques chromogènes,  
par exemple indigogéniques. Dans le cas de la détection de salmonelles, et plus  
30 généralement dans le cas de bactéries à activité estérase, la détection et/ou l'identification  
de ces bactéries est classiquement réalisée sur des milieux gélosés ou liquides

d'isolement, qui permettent la détection et/ou l'identification des colonies suspectes de bactéries à activité estérase.

Toutefois, on observe lors de certains prélèvements, notamment de fèces, la libération d'enzymes, non spécifiques du microorganisme que l'on souhaite détecter, et qui  
5 peuvent ultérieurement réagir avec le substrat chromogène. Cela induit la présence de faux positifs : certains prélèvements sont considérés comme contaminés alors qu'ils ne le sont pas, ce qui peut avoir des conséquences dramatiques pour le diagnostic ultérieur. Ainsi, dans le cas de la détection de salmonelles mises en évidence par une activité enzymatique de type estérase, il peut se produire une libération d'estérases par des  
10 sellés, non contaminées par des salmonelles, qui hydrolysent alors le substrat présent dans le milieu de culture, ce qui provoque la libération d'une coloration magenta, normalement spécifique des salmonelles.

La présente invention se propose donc d'améliorer les milieux permettant la détection de microorganismes actuellement commercialisés en limitant la présence de faux  
15 positifs.

A cet effet, la présente invention concerne un milieu de détection de microorganismes comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit marqué par au moins une première enzyme, spécifique desdits  
20 microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, différente de la première enzyme ou identique à celle ci mais non spécifique desdits microorganismes.

Au sens de la présente invention, le terme microorganisme recouvre les bactéries, les levures, et plus généralement, les organismes généralement unicellulaire, invisibles à  
25 l'œil nu, qui peuvent être multipliés et manipulés en laboratoire.

Au sens de la présente invention, on entend par milieu de culture, un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à la survie et/ou à la croissance de microorganismes. En pratique, l'homme du métier choisira le milieu de culture en fonction des microorganismes cibles, selon des critères parfaitement connus et à la portée de cet  
30 homme de l'art. Pour les bactéries, on peut citer à titre indicatif, les milieux sélectifs de type : Mac Conkey, Columbia ANC, PALCAM, Sabouraud Gentamycine-

Chloramphénicol, et les milieux non sélectifs de type Trypcase soja, milieu nutritif, Sabouraud. Le milieu de culture selon l'invention peut contenir d'éventuels autres additifs comme par exemple : un ou plusieurs substrats enzymatiques par exemple chromogène ou fluorogènes, des peptones, un ou plusieurs facteurs de croissance, des  
5 hydrates de carbone, un ou plusieurs agents sélectifs, des tampons, un ou plusieurs gélifiants... Ce milieu de culture peut se présenter sous forme de liquide de gel prêt à l'emploi, c'est à dire prêt à l'ensemencement en tube, flacon, ou sur boîte de Petri.

Le substrat est choisi parmi tout substrat pouvant être hydrolysé en un produit qui peut permettre la détection, directe ou indirecte d'un microorganisme. Ce substrat comprend  
10 une première partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler, et une seconde partie faisant office de marqueur, ci-après appelée partie marqueur, fluorescente ou chromogène. Comme substrat fluorescent, on peut citer notamment les substrats à base d'umbelliférone ou d'aminocoumarine, à base de résorufine ou encore à base de fluorescéine. Comme substrat chromogène, mieux adapté aux supports solides (filtre,  
15 gélose, gel d'électrophorèse), on peut citer notamment les substrats à base d'indoxyl et ses dérivés, et les substrats à base d'hydroxyquinoline ou d'esculétine et leurs dérivés, qui permettent la détection d'activités osidase et estérase. On peut citer également les substrats à base de nitrophénol et nitroaniline et dérivés, permettant de détecter les activités osidases et estérases dans le cas de substrats à base de nitrophénol, et des  
20 activités peptidases dans le cas de substrats à base de la nitroaniline. On peut citer enfin les substrats à base de naphтол et naphtylamine et ses dérivés, qui permettent de détecter les activités osidases et estérases par l'intermédiaire du naphтол, et les activités peptidases par l'intermédiaire de la naphtylamine. Ce substrat peut permettre notamment, mais d'une façon non limitative, la détection d'une activité enzymatique  
25 telle que l'activité d'une osidase, peptidase, estérase.

Par première enzyme, on entend une enzyme spécifique du microorganisme que l'on souhaite détecter. Cette enzyme peut être notamment, mais de façon non limitative, une osidase, peptidase, estérase, sulfatases, phosphatase...

Par deuxième enzyme, on entend une enzyme, différente de la première enzyme, ou  
30 identique à celle ci mais non spécifique du microorganisme que l'on souhaite détecter mais qui est libérée lors du prélèvement de l'échantillon. Cette deuxième enzyme est

susceptible de réagir avec le substrat, ce qui peut induire la présence de faux positifs. Cette enzyme peut être notamment, mais de façon non limitative, une osidase, peptidase, estérase, sulfatases, phosphatase...

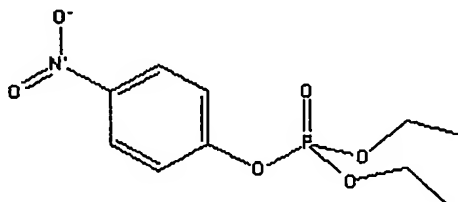
5 Par échantillon, on entend tout type d'échantillon dans lequel on souhaite détecter la présence de microorganismes. Cet échantillon peut provenir notamment, mais de façon non limitative, d'un prélèvement de sang, d'urine, de selles, d'aliments...

Selon un mode préféré de l'invention, le microorganisme est une bactérie, qui appartient préférentiellement au genre *Salmonella*.

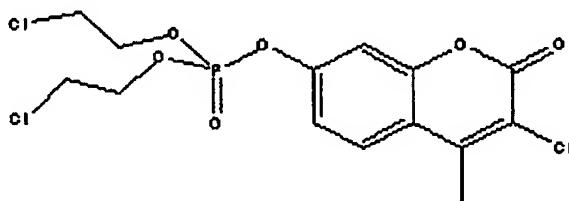
Selon un autre mode préféré de l'invention, ladite première enzyme est une estérase.

10

Selon un autre mode préféré de l'invention, l'inhibiteur appartient à la famille des organophosphates, et est préférentiellement le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate (Paraoxon ethyl, CAS n°311-45-5) ayant la formule suivante :



15 et/ou le O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate (Haloxon, CAS n°321-55-1) ayant la formule suivante :



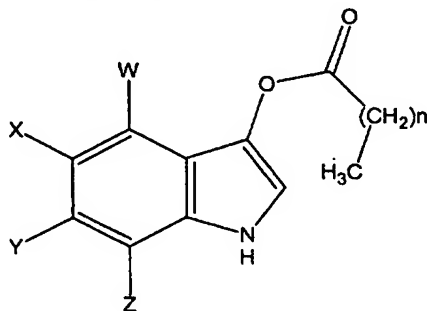
et/ou au moins un dérivé de ces molécules.

En effet, d'une façon surprenante, les inventeurs ont mis en évidence que l'utilisation de certaines molécules de type Paraoxon® et Haloxon®, qui sont des pesticides de la famille des organophosphates, permettent, une fois incluses dans le milieu de culture, d'inhiber l'expression des estérases libérées par le prélèvement.

La concentration en O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 0,1 et 15 mg/l, et encore plus préférentiellement entre 1 et 10 mg/l.

La concentration en O,O-Di(2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est préférentiellement comprise entre 1 et 1000 mg/l, et encore plus préférentiellement entre 30 et 100 mg/l.

Selon un mode préféré de l'invention, ledit substrat est un substrat chromogène, préférentiellement un ester d'indoxyl ou de ses dérivés, et encore plus préférentiellement un ester d'indoxyl ayant la formule suivante





avec n compris entre 2 et 12 et W, X, Y, Z sont choisis parmi H, Br, Cl, F, I. D'une façon encore plus préférentielle, le substrat est le 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl caprylate (Magenta C8).

5 L'invention concerne également un procédé de détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant :

- l'ensemencement desdits microorganismes à identifier sur un milieu de détection, tel que définit précédemment,
- l'incubation du milieu de détection ensemencé avec lesdits  
10 microorganismes à identifier, et
- la détermination de la présence desdits microorganismes par la détection du ou des substrats hydrolysés en un produit marqué.

L'ensemencement des microorganismes, tels que notamment les bactéries ou levures peut être réalisée par toutes les techniques d'ensemencement bien connues de l'homme  
15 du métier. De même, l'incubation est réalisée préférentiellement à une température pour laquelle l'activité enzymatique que l'on souhaite détecter est maximale, que l'homme du métier peut choisir aisément selon l'activité enzymatique à détecter. Dans le cas de la détection de l'activité esterase des salmonelles, l'incubation est préférentiellement réalisée entre 36 et 38°C.

20

L'invention concerne enfin l'utilisation du milieu de détection et/ou d'identification tel que défini ci dessus.

Les exemples ci dessous sont donnés à titre explicatif et n'ont aucun caractère  
25 limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

**Exemple 1 : Inhibition des enzymes libres par le paraoxon® éthyl (O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate)**

Le but des expériences présentées dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur  
30 des enzymes libres du paraoxon® éthyl (Riedel-deHaën, St Quentin Fallavier, France) sur des selles contaminées par des salmonelles.

Préparation du milieu de détection : un volume de 250 ml de milieu de détection est préparé à partir d'une poudre de milieu ayant la composition suivante :

	Peptones	6,25 g/l
5	Tris	0,16 g/l
	Lactose	6 g/l
	Sels biliaires	1,5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	14 g/l

- 10 La fonte est réalisée à 100°C, et le milieu est autoclavé 15 minutes à 121°C. On ajoute ensuite les additifs dans le milieu : Magenta C8 (500mg/l ; B-7102, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; X-glucoside (75 mg/l ; B-7250, BIOSYNTH, Staad, Suisse) ; cefsulodine (10 mg/l ; C 4786, Sigma, St Quentin Fallavier, France) et différentes concentrations de Paraoxon® éthyl (O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ; 36186, Riedel-deHaën, St
- 15 Quentin Fallavier, France ; 0 ; 1 ; 5 ou 10 mg/l).

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

- Ensemencement des bactéries *Salmonella* : 10µl de selles sont déposés sur boîte de Petri, cette suspension de selle est mélangée ou non à 10µl d'une suspension de
- 20 *Salmonella* (0,5 McF) et isolée en 3 cadrans sur une boîte de Petri. Différentes selles et différentes souches de *Salmonella* provenant de la collection de la demanderesse sont utilisées selon ce protocole. Les boîtes de Petri sont incubées 24 heures à 37°C. La lecture de l'apparition d'une coloration au niveau du point de dépôt de la selle et au niveau des colonies de *Salmonella* est effectuée selon une échelle semi-quantitative :

- 25 0 = absence de coloration  
0,5 = trace de coloration  
1 = coloration faible  
2 = coloration forte .

30

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1.

N° souche	N° selle	[Paraoxon éthyl] en mg/l							
		0		1		5		10	
		Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies	Dépôt	Colonies
absence	1	1	0	0,5	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6006	1	1	2	0,5	2	0	2	0	2
	2	0	2	0	2	0	2	0	2
2006	1	1	2	0,5	1	0	1	0	1
	2	0	2	0	1	0	1	0	1
1089	1	1	2	0,5	2	0	2	0	2
	2	0	2	0	2	0	2	0	2
1053	1	1	1	0,5	1	0	1	0	1
	2	0	1	0	1	0	1	0	1

**Tableau 1 : Effets du Paraoxon® éthyl (0 ; 1 ; 5 ou 10 mg/l) sur l'activité des enzymes libres**

Ces résultats montrent que les réactions enzymatiques aspécifiques sont inhibées fortement en présence de Paraoxon éthyl, ce qui limite la détection de faux positifs.

5

**Exemple 2 : Inhibition des enzymes libres par l'Haloxon® (O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate)**

Le but des expériences présentés dans cet exemple est de démontrer l'effet inhibiteur des enzymes libres de l'Haloxon® (Sigma, St Quentin Fallavier, France) sur des selles contaminées par des Salmonelles.

10

Préparation du milieu de détection : 250ml du milieu de l'exemple 1 dans lequel le paraoxon® éthyl est remplacé par différentes concentrations d'Haloxon (R276995, Sigma, St Quentin Fallavier, France; 0 ; 1 ; 10 ; 100 ou 1000 mg/l) sont préparés selon le procédé de l'exemple 1.

15

Les différents milieux de détection ainsi obtenus sont ensuite coulés en boîte de Petri.

Ensemencement des bactéries *Salmonella* : les boîtes de Petri sont inoculées, incubées et lues comme dans l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

N° souche	N° selle	[Haloxon] en mg/l									
		0		1		10		100		1000	
		Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies	Dépôt	Colo- -nies
absence	1	2	0	1	0	1	0	0,5	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6006	1	2	2	1	2	1	2	0,5	2	0	2
	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
2006	1	2	2	1	2	1	2	0,5	1	0	0,5
	2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	0,5
1089	1	2	2	1	2	1	2	0,5	2	0	2
	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
1053	1	2	1	1	1	1	1	0,5	1	0	1
	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1

**Tableau 2 : Effets de l'Haloxon® (0 ; 1 ; 10 ; 100 ou 1000 mg/l) sur l'activité des enzymes libres**

- 5 Ces résultats montrent que les réactions enzymatiques aspécifiques sont inhibées fortement en présence d'Haloxon, ce qui limite la détection de faux positifs.

A noter qu'une variante consiste à ajouter l'inhibiteur dans le milieu de prélèvement des bactéries au lieu de l'ajouter directement dans le milieu de culture

10 **Exemple 3 : Méthode pour identifier des inhibiteurs d'au moins une deuxième enzyme selon l'invention**

Cette méthode consiste à effectuer l'expérience des exemples 1 ou 2 en remplaçant :

- i) le milieu de culture décrit (y compris les substrats enzymatiques) par celui approprié aux microorganismes recherchés
- 15 ii) les selles par l'échantillon dans lequel on recherche lesdits microorganismes et qui produit une réaction parasite avec un ou plusieurs des substrats enzymatiques inclus dans le milieu
- iii) le paraoxon® ou l'haloxon® par l'inhibiteur potentiel à tester à différentes concentrations.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit marqué par au moins une première enzyme, spécifique des microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, différente de la première enzyme ou identique à celle-ci mais non spécifique desdits microorganismes.
- 10 2. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 1, caractérisé en ce que caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie.
3. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite bactérie appartient au genre *Salmonella*.
- 15 4. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite première enzyme est une estérase.
- 20 5. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'inhibiteur appartient à la famille des organophosphates.
- 25 6. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'inhibiteur est le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate et/ou le O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate et/ou au moins un dérivé de ces molécules.
- 30 7. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé

## REVENDICATIONS

1. Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit  
5 marqué par au moins une première enzyme, spécifique des microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, différente de la première enzyme ou identique à celle-ci mais non spécifique desdits microorganismes.
- 10 2. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie.
3. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite bactérie appartient au genre *Salmonella*.
- 15 4. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite première enzyme est une estérase.
- 20 5. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'inhibiteur appartient à la famille des organophosphates.
- 25 6. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'inhibiteur est le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate et/ou le O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate et/ou au moins un dérivé de ces molécules.
- 30 7. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé

## REVENDEICATIONS

1. Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant un milieu de culture et au moins un substrat qui peut être hydrolysé en un produit  
5 marqué par au moins une première enzyme, spécifique des microorganismes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un inhibiteur d'au moins une deuxième enzyme, différente de la première enzyme ou identique à celle-ci mais non spécifique desdits microorganismes, ladite deuxième enzyme étant libérée lors du prélèvement de l'échantillon.  
10
2. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie.
3. Milieu de détection et/ou d'identification, selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite bactérie appartient au genre *Salmonella*.  
15
4. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite première enzyme est une estérase.
- 20 5. Milieu de détection et/ou d'identification, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'inhibiteur appartient à la famille des organophosphates.
- 25 6. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'inhibiteur est le O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate et/ou le O,O-Di (2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate et/ou au moins un dérivé de ces molécules.
- 30 7. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Diethyl p-nitrophenyl phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 0,1 et 15 mg/l, préférentiellement entre 1 et 10 mg/l.

dans le milieu de détection est comprise entre 0,1 et 15 mg/l, préférentiellement entre 1 et 10 mg/l.

- 5 8. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Di(2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 1 et 1000 mg/l, préférentiellement entre 30 et 100 mg/l
- 10 9. Milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que ledit substrat est un substrat chromogène, préférentiellement un ester d'indoxyl ou de ses dérivés
- 15 10. Procédé détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant :
- l'ensemencement des microorganismes à identifier sur un milieu de détection, selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,
  - l'incubation du milieu de détection ensemencé avec les microorganismes à identifier, et
  - la détermination de la présence de microorganismes par la détection du ou des substrats hydrolysés en un produit marqué.
- 20 11. Utilisation du milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 9



dans le milieu de détection est comprise entre 0,1 et 15 mg/l, préférentiellement entre 1 et 10 mg/l.

5 8. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Di(2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 1 et 1000 mg/l, préférentiellement entre 30 et 100 mg/l

10 9. Milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que ledit substrat est un substrat chromogène, préférentiellement un ester d'indoxyl ou de ses dérivés

15 10. Procédé détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant :

- l'ensemencement des microorganismes à identifier sur un milieu de détection, selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,
- l'incubation du milieu de détection ensemencé avec les microorganismes à identifier, et
- la détermination de la présence de microorganismes par la détection du ou des substrats hydrolysés en un produit marqué.

20 11. Utilisation du milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9

8. Milieu de détection et/ou d'identification selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration en O,O-Di(2-chloroethyl)-O-(3-chloro-4-methylcoumarin-7-YL) phosphate ou son dérivé dans le milieu de détection est comprise entre 1 et 1000 mg/l, préférentiellement entre 30 et 100 mg/l
9. Milieu de détection et/ou d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que ledit substrat est un substrat chromogène, préférentiellement un ester d'indoxyl ou de ses dérivés
10. Procédé détection et/ou d'identification de microorganismes comprenant :
- l'ensemencement des microorganismes à identifier sur un milieu de détection, selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,
  - l'incubation du milieu de détection ensemencé avec les microorganismes à identifier, et
  - la détermination de la présence de microorganismes par la détection du ou des substrats hydrolysés en un produit marqué.
11. Utilisation du milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

➤ N° Indigo 0 825 83 85 87  
0,15 € TTC/mm

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		INHIBEST
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0304263
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
bioMérieux SA		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	<b>Nom</b>	JAMES
	<b>Prénoms</b>	Arthur
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	The Timbers, Hillside Road East
	<b>Code postal et ville</b>	IN1E16151 PT, Rothbury, Northumberland - GREAT BRITAIN
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>2</b>	<b>Nom</b>	ORENGA
	<b>Prénoms</b>	Sylvain
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	164 route du Suran Saint-André-le-Bas
	<b>Code postal et ville</b>	01161010 Neuville-sur-Ain - FRANCE
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>3</b>	<b>Nom</b>	PERRY
	<b>Prénoms</b>	John
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	12 Wolseley Gdns. Jesmond
	<b>Code postal et ville</b>	IN1E121H1R Newcastle-upon-Tyne - GREAT-BRITAIN
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Frédérique DENJEAN Ingénieur Brevets		



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235°03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.. / 2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		INHIBEST
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		08 04 268
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Milieu de détection et/ou d'identification de microorganismes		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
bioMérieux SA		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	ROGER-DALBERT
	Prénoms	Céline
Adresse	Rue	2 place des Droits de l'Homme
	Code postal et ville	10 1 11 51 01 Vaux-en-Bugey - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Frédérique DENJEAN Ingénieur Brevets		